

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Hideaki SUZUKI et al.
Appl. No.: NEW Group: Unknown
Filed: November 20, 2000 Examiner: UNKNOWN
For: IMMUNOASSAY OF HUMAN MEDULLASIN AND
DIAGNOSIS OF MULTIPLE SCLEROSIS USING
THE SAME



L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

November 20, 2000

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

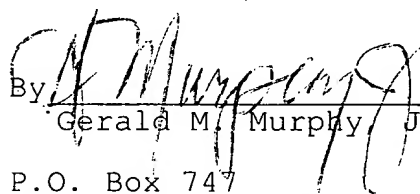
<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	26828/2000	February 3, 2000
JAPAN	26829/2000	February 3, 2000
JAPAN	121587/2000	April 21, 2000

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By: 
Gerald M. Murphy Jr., #28,977

P.O. Box 747
Falls Church, VA 22040-0747
(703) 205-8000

GMM:ewd
2167-0116P

Attachment

Hideaki SUZUKI et al.
Filed: 11-20-2000
Atty Docket 2167-D116P
BSKB
(703) 205-8000

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 2月 3日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-026828

出 願 人

Applicant (s):

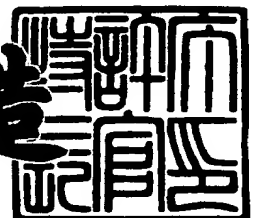
大日精化工業株式会社

1c862 U.S. PTO
09/715172
11/20/00

2000年 9月18日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3072240

【書類名】 特許願

【整理番号】 KM-037

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/53
G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 東京都足立区堀之内一丁目9番4号 大日精化工業株式会社 技術研究センター内

【氏名】 鈴木 英明

【発明者】

【住所又は居所】 東京都足立区堀之内一丁目9番4号 大日精化工業株式会社 技術研究センター内

【氏名】 高橋 樹由

【発明者】

【住所又は居所】 東京都足立区堀之内一丁目9番4号 大日精化工業株式会社 技術研究センター内

【氏名】 葛城 寿史

【発明者】

【住所又は居所】 東京都日野市南平四丁目19番2号 多摩南平パークスクエア119号

【氏名】 青木 洋祐

【特許出願人】

【識別番号】 000002820

【氏名又は名称】 大日精化工業株式会社

【代表者】 高橋 靖

【代理人】

【識別番号】 100087918

【弁理士】

【氏名又は名称】 久保田 耕平

【電話番号】 03(3264)8091

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067069

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9704477

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒトメダラシンの免疫学的測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト血液試料を浸透圧が $250\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より低い水性液体か、又は $310\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より高い水性液体で処理して白血球を完全に破壊した後に、抗ヒトメダラシン抗体を用いてヒト血液試料中のヒトメダラシンを定量することを特徴とする血液中のヒトメダラシンの免疫学的測定方法。

【請求項 2】 ヒト血液試料を浸透圧が $250\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より低い水性液体か、又は $310\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より高い水性液体で処理して白血球を完全に破壊した後に、不溶性担体に固定化した抗ヒトメダラシン抗体及び標識抗ヒトメダラシン抗体と接触させて抗原抗体反応によりサンドイッチ錯体を形成させてヒトメダラシンを不溶性担体上に捕捉し、次いで該錯体中の標識を定量することにより、ヒト血液試料中のヒトメダラシンを定量することを特徴とする血液中のヒトメダラシンの免疫学的測定方法。

【請求項 3】 前記抗ヒトメダラシン抗体の少なくとも一つが抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体である請求項 1 又は 2 に記載のヒトメダラシンの免疫学的測定方法。

【請求項 4】 前記水性液体が、水混和性有機溶媒を含んでいてもよい精製水及び／又は緩衝液である請求項 1 又は 2 に記載のヒトメダラシンの免疫学的測定方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血液中のヒトメダラシンを正確に測定するための血液試料の前処理を含むヒトメダラシンの免疫学的測定方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来技術】

セリンプロテアーゼの一種であるメダラシンは顆粒球等に存在し、炎症、特に慢性炎症の発現を含めて広く生体防御機構において重要な役割を演じていると考

えられる。顆粒球メダラシンは多くの慢性炎症性疾患の増悪期で増大し、寛解期で正常化するが、多発性硬化症の患者では増悪する数日前に著増し、寛解に先行して正常化することが認められている。多発性硬化症は、中枢神経系の白質に限局性の脱髄巣とグリオシスの出現を特徴とし、寛解と悪化を繰り返しながら進行し、多くは、10～15年の経過で死亡すると云う慢性炎症性の難病であり、原因については、未だ、はっきりとは解明されていないが、ウィルスや細菌が免疫系を刺激して抗体が自らの神経組織を攻撃する自己免疫疾患の一種ではないかと考えられている。また、その診断法はなかなか難しく、核磁気共鳴造影法（MRI）等によって行なわれているのが現状であるが、MRI等の方法は非常に大がかりな装置を用い、測定操作も熟練を要し、経費もかかるので、簡便な検査で病気の診断、病勢の把握、予後の推定等が行なえる方法の開発が検討され、血液中の顆粒球メダラシン活性の測定方法が研究され、簡便に測定できるメダラシンの免疫学的測定方法の開発が行われている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、ヒトメダラシンの免疫学的測定方法において、血液試料を水性媒体で希釈して測定する際に、顆粒球中に存在するメダラシンを完全に顆粒球の外に放出させるような処理を施すことなく測定を行うとその測定値の再現性が必ずしも良くなく、測定値にばらつきを生じる現象が認められた。従って、血液中のヒトメダラシンを免疫学的に再現性良く定量する測定方法の開発が望まれていたが、本発明は上記事情に鑑みなされたもので、ヒト血液試料に特定の前処理を施すことを含むヒト血液中のヒトメダラシンを再現性良く正確に測定できる免疫学的測定方法を提供することを課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行なった結果、ヒト血液試料をヒト血液の浸透圧と異なる特定の浸透圧を有する水性液体で血液を処理して白血球を完全に破壊した後に、抗ヒトメダラシン抗体を用いてヒトメダラシンを免疫学的に測定することにより、血液中のヒトメダラシンを再現性良く正確に

測定できることを見出し、これらの知見に基づいて本発明の完成に到達したものである。

【0005】

従って、本発明の第一は、ヒト血液試料を浸透圧が $250\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より低い水性液体か、又は $310\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より高い水性液体で処理して白血球を完全に破壊した後に、抗ヒトメダラシン抗体を用いてヒト血液試料中のヒトメダラシンを定量することを特徴とする血液中のヒトメダラシンの免疫学的測定方法に関するものである。

【0006】

また、本発明の第二は、ヒト血液試料を浸透圧が $250\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より低い水性液体か、又は $310\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より高い水性液体で処理して白血球を完全に破壊した後に、不溶性担体に固定化した抗ヒトメダラシン抗体及び標識抗ヒトメダラシン抗体と接触させて抗原抗体反応によりサンドイッチ錯体を形成させてヒトメダラシンを不溶性担体上に捕捉し、次いで該錯体中の標識を定量することを特徴とする血液中のヒトメダラシンの免疫学的測定方法に関するものである。

更に、本発明によれば、抗ヒトメダラシン抗体の少なくとも一つが抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体である血液中のヒトメダラシンの免疫学的測定方法を提供することができる。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明につき更に詳しく説明する。

本発明において測定されるべきヒト血液試料中のヒトメダラシンの大部分は、血液中に存在する白血球成分の一つである顆粒球の内部に存在しているので、顆粒球を完全に破壊してヒトメダラシンを全て細胞外に放出させてから測定することが正確な測定値を得るための必須要件である。従って、この必須要件が完全に満たされない場合には測定値はバラツキが大きく、再現性の乏しいデータしか得られない。

【0008】

血液試料中の顆粒球を完全に破壊する方法としては、機械的方法、超音波によ

る方法、凍結融解を繰り返す方法、及び浸透圧の異なる水性液体で処理する方法等が考えられるが、血液と異なる浸透圧を有する水性液体で処理する方法が最も簡便で実用的である。ヒト血液の浸透圧は約 $280 \sim 290 \text{mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$ の範囲にあるので、 $250 \sim 310 \text{mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$ の範囲の水性液体では血液中に存在する顆粒球を完全に破壊することは難しい。従って、ヒト血液中の顆粒球の完全な破壊は浸透圧が $250 \text{mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$ より低い水性液体、又は $310 \text{mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$ より高い水性液体で血液を希釈することで達成することができる。このような水性液体としては、水混和性有機溶媒を含んでいてもよい精製水、無機酸塩、有機酸塩、糖類、糖アルコール類、アミノ酸類、及び蛋白質等の水溶性物質からなる溶質の濃度が非常に高い水溶液、又はこれらの溶質の濃度が非常に低い水溶液等の水性液体であり、顆粒球を完全に破壊し得る浸透圧を有する水溶液及び緩衝液などを用いることができる。また、該水性液体の使用量は、血液試料に対して容積単位で $50 \sim 10$ 万倍、好ましくは $100 \sim 1$ 万倍、特に好ましくは $500 \sim 2$ 千倍である。

【 0 0 0 9 】

このようにして得られた顆粒球を完全に破壊したヒト血液試料の水性希釈液を試料とするヒトメダラシンの免疫学的測定方法は、測定試料を標識化した抗原又は抗体の存在下に抗ヒトメダラシン抗体と接触させ、抗原抗体反応により標識化免疫複合体として捕捉する免疫反応段階と、生成した該免疫複合体をその分子中に存在する標識物質を用いて測定する検出段階とからなる。免疫反応段階を構成する抗原抗体反応の方法は任意である。

【 0 0 1 0 】

例えば、

- ①不溶性担体に結合した抗体に試料中の測定すべき抗原を捕捉させた後に標識抗体を反応させるサンドイッチ法、
- ②サンドイッチ法において、不溶性担体に結合した抗体と異なる動物種に由来する抗体を用い、生成したサンドイッチ錯体に対して、更にこの抗体に対する標識した第二抗体を反応させる二抗体法、
- ③不溶性担体に結合した抗体に試料中の測定すべき抗原をペルオキシダーゼ酵素標識抗原の存在下で反応させる競合法、

④測定すべき抗原を含有する試料にこれらと特異的に反応する標識抗体を作用させて凝集沈殿させた後、遠心分離により分離により免疫複合体中の標識物質を検出する凝集沈殿法、更に、

⑤ビオチン標識抗体に標識アビジンを反応させるビオチン-アビジン法等を非限定的に用いることができる。

【0011】

本発明のヒトメダラシンの免疫学的測定方法において不溶性担体を用いる場合には、不溶性担体としては、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子化合物、その他、ガラス、金属、磁性粒子及びこれらの組み合わせ等が挙げられる。また、不溶性担体の形状としては、例えば、トレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、マイクロプレート、試験管等の種々の形状で用いることができる。更に、これら不溶性担体への抗原又は抗体の固定化方法は任意であるが、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法等を用いることができる。

【0012】

尚、本発明のヒトメダラシンの免疫学的測定方法において用いられる抗体類のクラスは任意であるが、IgG クラスの抗体が好適に用いられる。また、抗体はモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれを使うことも可能であるが、モノクローナル抗体が好ましい。それらの形態としては全抗体又は $F(ab')_2$ 、 Fab 等の断片を用いることができる。また、抗体の起源は任意であるが、マウス、ラット、兎、羊、山羊、鶏等に由来する抗体が好適に用いられる。

【0013】

次に、このようにして捕捉されたヒトメダラシンの標識化免疫複合体を検出段階で測定するための標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質及び放射性物質等を使用するのが好適である。このような酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ等、蛍光物質としては、フルオレッセインイソシアネート、フィコビリプロテイン等、発光物質としては、ルミノール類、ジオキセタン類、アクリジニウム塩類等、放射性物質としては、 ^{125}I

^{131}I 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等を非限定的に挙げる事ができる。標識物質が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤、蛍光剤、及び発光剤等が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質として過酸化水素等を用い、発色剤として2,2'-アジノジ[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩(ABTS)、5-アミノサリチル酸、*o*-フェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等、蛍光剤としては4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸等、発光剤としてはルミノール類、ルシゲニン電荷移動錯体等、酵素としてアルカリホスファターゼを用いる場合には、基質として4-ニトロフェニルホスフェート、4-メチルウムベリフェリルホスフェート、コルチゾール-21-ホスフェート等、酵素として β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合には、2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド、4-メチルウムベリフェリル- β -D-ガラクトシド、3-(2'-スピアアダマンタン)-4-メトキシ-4(3''- β -D-ガラクトシルオキシフェニル)-1,2-ジオキセタン(AMPGD)等を用いることができる。

【0014】

本発明のヒトメダラシンの免疫学的方法において使用することができるポリクローナル抗体は、従来公知の方法でヒトメダラシンを抗原として動物に免疫して得られる抗ヒトメダラシン抗血清の抗体成分として分離精製されたものが好ましい。なかでも例えば、山羊抗ヒトメダラシン-ポリクローナル抗体、兎抗ヒトメダラシン-ポリクローナル抗体等が好適に用いられる。また、本発明に使用することができるモノクローナル抗体及びその製造方法については、先に出願された特開平11-151085(発明の名称「抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体、その製造方法及びそれを用いる免疫学的測定方法」)の特許出願明細書に詳細に説明されている。

【0015】

即ち、本発明のヒトメダラシンの免疫学的測定方法において使用することのできる抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体は、健常人血液から分離した顆粒球より抽出したヒトメダラシンで免疫した動物から採取した抗体産生細胞とミエロー

マ細胞との細胞融合により調製されるハイブリドーマを培地上で培養するか、又は動物腹腔内に投与して腹水内で増殖させた後、該培養物又は腹水から採取することにより製造される。

【 0 0 1 6 】

抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、抗原としてメダラシンを用いて免疫した動物から採取した抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させることにより得られるハイブリドーマを選択的に増殖させ、該ハイブリドーマから検索しクローニングにより製造することができる。

【 0 0 1 7 】

上記の抗体産生細胞としては、例えばヒトメダラシン又はこれを含む組成物又は細胞を投与して免疫した動物から得られる脾臓細胞、リンパ節細胞、Ｂ－リンパ球等が挙げられる。免疫する動物としてはマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ等が挙げられる。免疫は、例えばヒトメダラシンをそのまま又は適当なアジュバントと共に動物の皮下、筋肉内又は腹腔内に約 $1\mu\text{g}\sim 1\text{mg}$ /回を 1～2 回/月、1～6 ヶ月間投与することにより行なわれる。抗体産生細胞の分離は、最終免疫から 2～4 日後に免疫動物から採取することにより行なわれる。

ミエローマ細胞としては、マウス、ラット由来のもの等を使用することができる。抗体産生細胞とミエローマ細胞とは同種動物由来であることが好ましい。

【 0 0 1 8 】

細胞融合の方法は任意で、限定されるものではないが、例えばダルコッペ改変イーグル培地 (DMEM) 等の培地中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコール等の融合促進剤の存在で混合することにより行なうことができる。

細胞融合終了後、DMEM等で適当に希釈し、遠心分離し、沈殿を HAT 培地等の選択培地に懸濁して培養することによりハイブリドーマを選択する。次いで、培養上清を用いて酵素抗体法により抗体産生ハイブリドーマを検索し、限界希釈法等によりクローニングを行ない、抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

【 0 0 1 9 】

このようにして得られた抗体産生ハイブリドーマを培地中又は生体内で培養しモノクローナル抗体を培養物から採取する。モノクローナル抗体を大量に製造するには、該ハイブリドーマをミエローマ細胞の由来細胞と同種の動物腹腔内に投与し、その腹水中にモノクローナル抗体を蓄積させ、腹水から採取する方法を採ればよい。

【 0 0 2 0 】

培養物又は腹水からのモノクローナル抗体の分離は、IgG 精製に通常使用される硫酸分画法、陰イオン交換体又はプロテイン A、G 等のカラムによるクロマトグラフィーによって行なうことができる。

このようにして得られた抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体は、これを産生するハイブリドーマの種類により 3 F 0 3、3 G 0 3、2 E 0 4、及び 1 G 1 2 の 4 種類存在する。これらのモノクローナル抗体は、いずれもグロブリンクラスは IgG で、サブクラスは IgG₁ であり、いずれの抗体も抗原であるヒトメダラシンと特異的に反応する。従って、上記抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体は本発明のヒトメダラシンの免疫学的測定方法には有用である。

【 0 0 2 1 】

【実施例】

以下、参考例と共に、実施例を示し、本発明を具体的に説明する。もっとも、本発明は実施例等により限定されるものではない。尚、実施例中の % は重量 % を意味する。

【 0 0 2 2 】

〔参考例 1〕

精製ヒトメダラシンの調製

健常人血液 400ml に、デキストラン（分子量 200,000～300,000）の 6 % 生理食塩水溶液を血液：デキストラン水溶液 = 2 : 1 の割合で混合し、ガラス棒等で軽くかき混ぜてから、4～8℃の温度で約 1 時間静置した後、沈殿した赤血球を上清と分離し、この上清を 15,000rpm で遠心分離して沈殿を採取して白血球を得た。次に、この白血球に 1mM エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム塩（EDTA）

、1mM p-クロロマーキュリー安息香酸 (PCMB) を含むpH7.0 の1Mリン酸カリウム緩衝液 (PKB) からなる抽出用液を加えて、攪拌下に37℃の温度で20分間インキュベートした後、15秒間超音波破碎機にかけて完全に細胞を破碎した。更に、37℃の温度で20分間インキュベートしてから、4℃の温度において 12,000rpmで10分間遠心分離して上清を採取し、この上清を蒸留水に対して透析し、沈渣は上記と同様の操作を数回繰り返して抽出を行なった。次いで、この抽出液を50mM PKB (pH6.0) で平衡化したCM-セファロースゲルカラムに通した後、同じ緩衝液で洗浄してから、1M PKB (pH6.0) で吸着物を溶出し、溶出液を蒸留水に対して一晩透析して脱塩してから、コロジオン膜で濃縮することにより、精製ヒトメダラシン 1.5mgが得られた。

【 0 0 2 3 】

〔参考例2〕

抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体の製造

(1) 抗体産生細胞とミエローマ細胞の細胞融合によるハイブリドーマの調製

参考例1でヒト顆粒球から抽出、精製したヒトメダラシンを、フロイント完全アジュバントで乳化し、7週齢のBALB/Cマウスの皮下に50 μ g/匹の量で投与した。そして、4週間後にこのマウスに初回と同様の方法で追加免疫を行ない、7日後に血中に抗体量が増大したことを確認した後、更に、その7日後に最終免疫として抗原を腹腔に50 μ g/匹の量で投与した。一方、20%の牛胎児血清を添加したDMEM培地中で、マウスミエローマ細胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) を維持培養しておき、最終免疫の3日後、このマウスから脾臓細胞を採取して、これをポリエチレングリコール4000を用いてP3U1と細胞融合させ、96穴マイクロプレートに撒いた。細胞融合後、培地を100 μ M ヒポキサンチン、0.4 μ M アミノプテリン、16 μ M チミジンを添加したDMEM (HAT培地) に置換して、2~3 週間選択培養することにより脾臓細胞とミエローマ細胞との融合体であるハイブリドーマが得られた。

【 0 0 2 4 】

(2) 抗ヒトメダラシン抗体産生性ハイブリドーマのスクリーニング

次に、このハイブリドーマの培養液中の抗体活性を、ELISA (Enzyme Lin

ked Immuno Sorbent Assay) でスクリーニングした。即ち、ヒトメダラシンを E L I S A 用のマイクロプレートに吸着させ、pH7.4の10mMリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) に 2%の牛血清アルブミン (B S A) を添加した溶液でブロッキング処理を行なった後、ハイブリドーマ培養液50 μ l をこのマイクロプレートに添加して1時間放置してから、ハイブリドーマ培養液を除去して洗浄し、これにペルオキシダーゼ標識山羊抗マウス IgG-Fc特異抗体の 2 μ g/ml P B S 溶液 100 μ l を添加し、37℃で1時間反応させた。次いで、この酵素標識抗体溶液を除去し洗浄した後、0.05% A B T S、及び0.0034%過酸化水素を含む0.1Mリン酸クエン酸緩衝液 (pH4.6) を 200 μ l 添加して発色させることにより抗ヒトメダラシン抗体産生性ハイブリドーマを選別した。

【0025】

(3) 抗体産生株のクローニング及びモノクローナル抗体の調製

この抗ヒトメダラシン抗体産生性ハイブリドーマ培養液を採取し、限界希釈法によるクローニングを行なって最終的に単一クローンのハイブリドーマ4種類を得た。このハイブリドーマを、それぞれプリスタン投与B A L B / Cマウスの腹腔に投与して増殖させ、モノクローナル抗体を含む腹水を得た。次いで、得られた腹水に50%飽和硫酸を加えて抗体を沈殿させ、この沈殿を分離してP B S に溶解させ、3MNaCl含有50mMトリス-塩酸緩衝液 (pH7.8) に対して透析してから、プロテインA-セファロースC L 4 Bカラム (ファルマシア社製) にかけた後、吸着した抗体を0.1Mグリシン-塩酸緩衝液 (pH5.0) で溶出し中和して精製することにより3F03、3G03、2E04、及び1G12からなる 4種類のモノクローナル抗体を得た。

【0026】

(4) モノクローナル抗体の性質〔ウェスタンブロッティング法〕

モノクローナル抗体に特異的な抗原をウェスタンブロッティング (Western blotting) 法を用いて固定した。

先ず、ヒト顆粒球由来メダラシンをS D S -ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、電解液バッファーに25mMグリシン、及び20%メタノールを含む溶液を用い、電圧傾斜が 7V/cm、2時間の条件でスラブゲルから蛋白をニトロセルロ

ースシートへ移した。次に、ニトロセルロースシートの各レーンを切り離し、一方のシートをアミドブラックで蛋白染色し、他方は次の様な酵素免疫アッセイを行なった。即ち、2% BSA/PBSでブロッキング処理した後、1次抗体としてマウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を加え、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識山羊抗マウス IgG-Fc特異抗体を加えて反応させ、洗浄してから、0.04% 3,3'-ジアミノベンジジン、及び0.0034%過酸化水素を含むPBSからなる基質溶液を加えて発色させることにより、4種のマウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体は、ヒト顆粒球由来メダラシンを認識することが確認された。

【0027】

〔インヒビション・アッセイ法〕

ELISA用マイクロプレートに固定したヒトメダラシンに対して、ビオチン化した第一の抗体と非標識の第二の抗体を共存させて反応させた後、アビジン化ペルオキシダーゼを反応させ、次いで、このペルオキシダーゼを基質溶液の添加により発色させてビオチン化抗体の反応量を測定するインヒビション・アッセイ (Inhibition assay) 法により、いずれの2つの組み合わせにおいてもビオチン化抗体の反応量に変化がないことより、4種のモノクローナル抗体はいずれも互いに異なるエピトープ (抗原部位) を認識することが確認された。

【0028】

〔実施例1〕

ヒトメダラシン測定用検量線の作成

(1) モノクローナル抗体固定化ビーズの調製

ポリスチレン製ビーズ (直径 6mm) をよく洗浄してから、マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04) 10 μ g/mlを含むPBS (pH7.4) 溶液中に 4℃の温度で1昼夜放置した後、PBSで洗浄し、1% BSA水溶液に 4℃の温度で1昼夜放置してブロッキング処理を施すことによりモノクローナル抗体固定化ビーズが得られた。

【0029】

(2) ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体の調製

マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04) 1.0mg/mlを含むPBS溶

液に、N-(α -マレイミド安息香酸)-N-サクシンイミドエステル(MBS)の10mg/mlの濃度のジメチルホルムアミド溶液0.1mlを添加し、25℃の温度で30分間反応させた。次いで、この反応混合液をセファデックスG-25を充填したカラムを用い、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)でゲル濾過を行ない、マレイミド化モノクローナル抗体と未反応MBSとを分離した。

一方、ペルオキシダーゼ酵素としてホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ(HRP)の1.0mg/mlのPBS溶液に、N-サクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート(SPDP)の10mg/mlの濃度のエタノール溶液を添加し、25℃の温度で30分間反応させた。次いで、この反応混合液をセファデックスG-25を充填したカラムを用い、10mM酢酸緩衝液(pH4.5)でゲル濾過して精製、ピリジジスルフィド化HRPを含有する画分を採取し、これをコロジオンバック中において氷冷下に約10倍に濃縮した。次に、これに0.1Mジチオスレイトールを含有する0.1M酢酸緩衝生理食塩水(pH4.5)1mlを添加して、25℃の温度で30分間攪拌してHRP分子中に導入したピリジジスルフィド基を還元した後、この反応混合液をセファデックスG-25を充填したカラムを用いてゲル濾過し、チオール化HRPを含有する画分が得られた。

次に、マレイミド化モノクローナル抗体とチオール化HRPとを混合し、コロジオンバックを用いて氷冷下に4mg/mlの蛋白質濃度まで濃縮し、4℃で一昼夜放置した後、ウルトロゲルAcA44(SEPRACOR社)を充填したカラムを用いてゲル濾過し、ペルオキシダーゼ酵素標識モノクローナル抗体が得られた。

【0030】

(3) ヒトメダラシンのサンドイッチ酵素免疫測定方法

マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体(3F03)を固定化したビーズ各1個と、精製したヒトメダラシン(標準物質)0,1,10,100,200ng/mlの濃度で含有する2%BSA含有PBS溶液50 μ lと2%BSA含有PBS溶液350 μ lを加え37℃の温度で30分間インキュベートし、次いで試験管内の溶液を吸引除去した後、生理食塩水で洗浄してからHRP標識マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体(2E04)0.2 μ g/mlの濃度で含有する2%BSA含有PBS溶液400 μ lを試験管に充填して37℃の温度で30分間インキュベートした。次に、試験管内の溶

液を吸引除去した後、生理食塩水で洗浄してから、0.05% A B T S、及び0.0034%過酸化水素を含む0.1Mリン酸クエン酸緩衝液(pH4.6)を400 μ lずつ各試験管内に加え、37℃の温度で30分間インキュベートした後、反応停止剤として0.1Nシュウ酸水溶液を1mlずつ加えて酵素反応を停止させた。次いで、この溶液を分光光度計を用いて420nmの波長の吸光度を測定し、これを標準物質濃度に対してプロットすることにより、図1に示されるような濃度依存性の良い検量線が得られた。

【 0 0 3 1 】

〔実施例2〕

酵素免疫測定方法による臨床検体中のメダラシンの測定

健常人及び多発性硬化症患者の血液をそれぞれ採取して凍結保存した試料を室温に戻して融解させ、その10 μ lを採取して精製水(浸透圧=0mOsm/kg \cdot H₂O)2ml中に加えボルテックスミキサーを用いて十分混合して検体溶液とした後、その10 μ lを試験管に添加し、これに2%B S A含有P B S (pH7.4)390 μ lを加えて希釈した。次に、この試験管にマウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体(3F03)を固定化したビーズ各1個を加え37℃の温度で30分間インキュベートし、次いで試験管内の溶液を吸引除去した後、生理食塩水で洗浄してからH R P 標識マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体(2E04)0.2 μ g/mlの濃度で含有する2%B S A含有P B S 溶液400 μ lを試験管に充填して37℃の温度で30分間インキュベートした。次に、前述の検量線を作成する場合と全く同じ操作により、洗浄、酵素反応及び反応停止を行なった後、分光光度計を用いて420nmの波長の吸光度を測定し、検量線よりヒトメダラシン濃度を求めた。この測定の再現性を検討する目的で測定操作を検体希釈処理から別個に5回行った結果、検体血液中のヒトメダラシン濃度は、第1表に示すように非常に良好な再現性を示すことが確認された。

【 0 0 3 2 】

【表 1】

第1表 血液中ヒトメダラシン測定値

測定回	測定値 ($\mu\text{g/ml}$)	
	健常人	患 者
1	8.2	37.2
2	8.0	35.9
3	8.2	35.5
4	7.9	36.4
5	8.2	35.8
平均	8.1	36.2
変動係数(%)	1.7	1.8

【0 0 3 3】

【比較例 1】

酵素免疫測定方法による臨床検体中のメダラシンの測定

健常人及び多発性硬化症患者の血液をそれぞれ採取して凍結保存した試料を室温に戻して融解させ、その $10\mu\text{l}$ を採取しPBS (pH7.4) (浸透圧=約 $290\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$) 2ml 中に加えて均一に混合して検体溶液とした後、その $10\mu\text{l}$ を試験管に添加し、これに 2% BSA 含有 PBS (pH7.4) $390\mu\text{l}$ を加えて希釈した。次に、この試験管にマウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (3F03) を固定化したビーズ各 1 個を加え 37°C の温度で30分間インキュベートし、次いで試験管内の溶液を吸引除去した後、生理食塩水で洗浄してからHRP 標識マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04) $0.2\mu\text{g/ml}$ の濃度で含有する 2% BSA 含有 PBS 溶液 $400\mu\text{l}$ を試験管に充填して 37°C の温度で30分間インキュベートした。次に、前述の検量線を作成する場合と全く同じ操作により、洗浄、酵素反応及び反応停止を行なった後、分光光度計を用いて 420nm の波長の吸光度を測定し、検量線よりヒトメダラシン濃度を求めた。この測定の再現性を検討する目的で測定操作を検体希釈処理から別個に 5 回行った結果、検体血液中のヒトメダラシン濃度の測定値は第 2 表に示すように再現性が必ずしも良好とはいえないデータを示

した。

【0034】

【表2】

第2表 血液中ヒトメダラシン測定値

測定回	測定値 ($\mu\text{g/ml}$)	
	健常人	患 者
1	7.8	28.8
2	6.6	25.2
3	7.1	27.0
4	5.9	21.6
5	6.9	26.3
平均	6.9	25.8
変動係数 (%)	10.1	10.4

【0035】

【発明の効果】

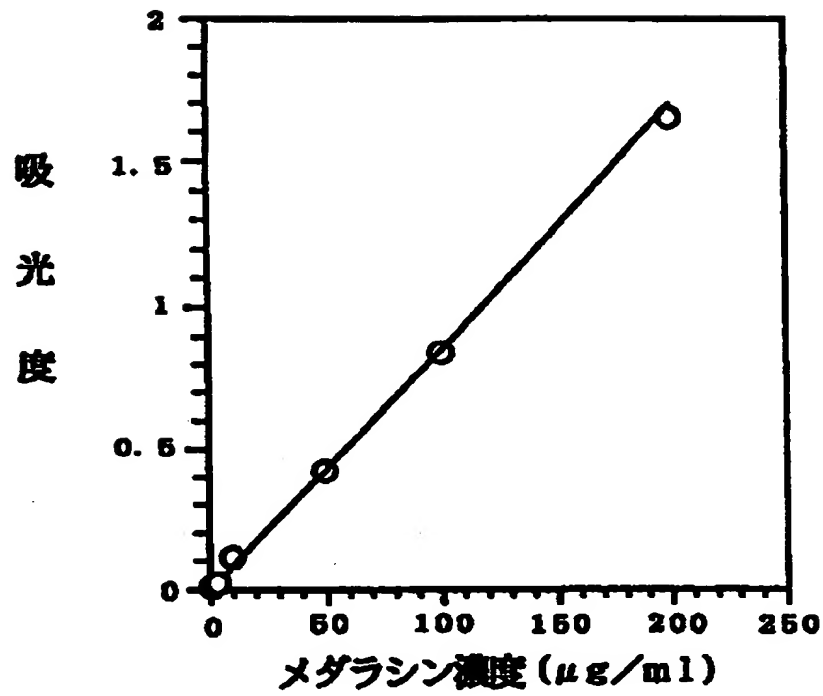
以上説明した本発明の構成により、ヒト血液試料中のヒトメダラシン量を再現性よく正確に測定することが可能となり、慢性炎症性疾患、特に多発性硬化症の血液診断等への利用の可能性が期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1記載の酵素免疫測定方法を用いてヒトメダラシン（標準物質）を測定し、その吸光度を抗原濃度の関数としてプロットして作成したヒトメダラシン測定用の検量線である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 血液中の白血球成分の一つである顆粒球の内部に存在するヒトメダラシンを抗ヒトメダラシン抗体を用いて高精度で、かつ再現性よく定量することが可能な免疫学的測定方法を提供する。

【解決手段】 抗ヒトメダラシン抗体を用いて血液中のヒトメダラシンを測定する際に、ヒト血液試料を血液の浸透圧と異なる特定の浸透圧を有する水性液体で処理して白血球を完全に破壊した後、前記抗ヒトメダラシン抗体を用いて血液試料中のヒトメダラシンを定量する血液中のヒトメダラシンの免疫学的測定方法。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-026828
受付番号	50000122071
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成12年 2月 4日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成12年 2月 3日

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002820]

1. 変更年月日 1990年 8月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋馬喰町1丁目7番6号

氏 名 大日精化工業株式会社